

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-310097

(P2003-310097A)

(43)公開日 平成15年11月5日 (2003.11.5)

(51)Int.Cl.⁷
A 01 K 67/027
C 12 N 15/09

識別記号
Z N A

F I
A 01 K 67/027
C 12 N 15/00

テ-マコ-ト⁸ (参考)
Z N A 4 B 0 2 4
A

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 16 頁)

(21)出願番号 特願2002-118714(P2002-118714)

(22)出願日 平成14年4月22日 (2002.4.22)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年11月26日
発行の「第24回日本分子生物学会年会 プログラム・講
演要旨集」に発表

(71)出願人 396020800
科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(72)発明者 岡野 栄之
東京都文京区本駒込6-13-15 メゾン・
ド・ジャルダン104号
(72)発明者 楠原 伸一
栃木県下都賀郡壬生町落合2-12-2 小
貫マンション201
(74)代理人 110000084
特許業務法人アルガ特許事務所

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 ムサシ蛋白質2遺伝子欠損動物

(57)【要約】

【解決手段】 ムサシ蛋白質2遺伝子の機能が欠損した
非ヒト動物又はその子孫。

【効果】 本発明のMsi2遺伝子、又はMsi2及びMsi1遺伝
子欠損動物は、Msi1及びMsi2の内分泌系細胞における役
割を解明するために有用であり、高血糖症、低血糖症及
び糖尿病のモデル動物としても有用であり、これらの疾
患治療薬のスクリーニングに使用することもできる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ムサシ蛋白質2遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物又はその子孫。

【請求項2】 さらにムサシ蛋白質1遺伝子の機能が欠損しているものである請求項1記載の動物。

【請求項3】 ムサシ蛋白質2遺伝子のいずれかの部位が欠失しているか、又はムサシ蛋白質2遺伝子のいずれかの部位に他の遺伝子が挿入されることによりムサシ蛋白質2遺伝子の機能が欠損したものである請求項1記載の動物。

【請求項4】 ムサシ蛋白質1遺伝子のいずれかの部位が欠失しているか、又はムサシ蛋白質1遺伝子のいずれかの部位に他の遺伝子が挿入されることによりムサシ蛋白質1遺伝子の機能が欠損したものである請求項2記載の動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は高血糖症、低血糖症及び糖尿病の治療薬の評価、これらの疾患のメカニズム解明等に有用なトランスジェニック非ヒト動物に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】神経前駆細胞の増殖または分化において機能する多くの転写因子が同定されている。しかしながら、近年の神経細胞特異的RNA結合蛋白質の発見は、転写後調節の段階においても、前駆細胞からの神経細胞の発生が制御されている可能性を高めている。これらにはmRNAの安定化または翻訳調節による制御が含まれる。非脊椎動物および脊椎動物の両者で神経細胞RNA結合蛋白質が発見されており、これらは2種の遺伝子ファミリーに相当する。(Okano, Dev. Growth Diff. 37:619-629(1995))。ひとつは、Elavファミリーであり、このファミリーのメンバーは分裂後神経細胞で発現されており、神経細胞の生存または分化において機能していると考えられている(Akamatsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9885-9890(1999))。もう一つのファミリーであるムサシ(Musashi:Ms1)ファミリーは、Elavファミリーと対照的に主として神経前駆細胞で発現している(Sakakibara et al., Dev. Biol. 176:230-242(1996); Pincus et al., Ann. Neurol. 43:576-585(1998); Kaneko et al., Dev. Neurosci. 22:139-153(2000))。

【0003】また、かなりのMs1蛋白質が成体になってからも継続して発現している(Sakakibara and Okano, J. Neurosci. 17:8300-8312(1997))。このように神経細胞の発生と維持に重要な役割を果たしているMs1ファミリーのうち、ムサシ蛋白質1(Musashi1;Ms1)についてはクローニングされている(Sakakibara et al., Dev. Biol. 176:230-242(1996))。しかし、哺乳類におけるもう一つのタイプであるムサシ蛋白質2(Musashi2;Ms1

2)については、我々がその存在を示唆していたにすぎず、その機能も明らかにはされておらず、クローニングもされていない。そこで本発明者は、Ms12遺伝子をクローニングすべく種々検討した結果、成体マウス小脳より得られたラムダgt11 cDNAライブラリーよりクローニングに成功し、先に特許出願した(特願2001-250186)。しかしながら、成体におけるMs12の機能についてはほとんど知られておらず、解明がまだれている。

【0004】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者らは成体マウスの脾臓においてMs11、Ms12、Numbがどのような発現パターンを示すかを検討したところ、意外にもMs11、Ms12及びNumbはともに内分泌細胞が存在するテングルハンス島全体に発現していることが判明した。そこで、Ms12ノックアウトマウス、Ms11及びMs12ダブルノックアウトマウスを作製したところ、これらのノックアウトマウスは脾臓においてインスリンとともにグルカゴンを異常発現しており、高血糖症、低血糖症及び糖尿病のモデル動物として有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明はMs12遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物又はその子孫を提供するものである。また、本発明はMs11遺伝子及びMs12遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物又はその子孫を提供するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明におけるマウスMs12は、本発明者らが初めてクローニングしたRNA結合性蛋白質であり、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列を有するものである。ここで、配列番号2は、配列番号1における18アミノ酸(264から281)が欠失したアミノ酸配列を有するものである。これらの2種はMs12のアイソフォームである。配列番号1をMs12L、配列番号2をMs12Sという。Ms12は、2個のRNA結合モチーフ(RRMs)を有し、これらのRRMsはRNA結合蛋白質間でよく保存された配列であるRNP-1とRNP-2を有する。

【0007】Ms12遺伝子は、(1)配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するものである。その塩基配列としては、配列番号3、4又は5で示される塩基配列が挙げられる。なお、配列番号3はMs12遺伝子の全配列であり、配列番号4はMs12Lのコード領域であり、配列番号5はMs12Sのコード領域である。

【0008】Ms12遺伝子は、脊椎動物、例えばマウスの小脳を用いてcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望のクローニングを選択する方法により得ることができる(Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613(1981); Science, 222, 778(1983)など)。Ms12遺伝子をcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、

例えばcDNAによって產生される蛋白質(Msi2)に対して、該蛋白質の特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、これらの組合せなどを例示できる。

【0009】Msi1遺伝子は前記のSakakibara et al., Dev. Biol., 176:230-242(1996)により得ることができる。Msi1のアミノ酸配列及びMsi1遺伝子の塩基配列を配列番号6に示す。

【0010】本発明において、「遺伝子の機能が欠損した」とは、該遺伝子の遺伝子産物であるMsi2又はMsi1が正常に產生されないことをいい、Msi2又はMsi1自体が產生されないこと及び一部を欠損するなどして機能を発現し得ないMsi2又はMsi1様タンパク質を產生することが含まれる。

【0011】本発明のMsi2遺伝子の機能欠損動物を得るためにには、これらの遺伝子をクローニングし、インビトロで該遺伝子の機能を欠損させた後に、該欠損遺伝子を動物に戻して染色体上のMsi2遺伝子との間で相同組換えを起こさせ、染色体上のMsi2遺伝子を破壊し、その動物自体又はその子孫の該遺伝子の機能を欠損させるという方法が一般的に用いられる。またMsi2及びMsi1遺伝子の機能欠損動物を得るには、上記の方法で作成したMsi2機能欠損動物を既存のMsi1機能欠損動物(特開2001-17027)と交配させることによって得られる。

【0012】遺伝子の機能を欠損させる方法としては、遺伝子に人为的に変異を加えて該遺伝子を破壊する方法が挙げられ、例えばプロモーター領域及び/又はコード領域の少なくとも一部の欠失や、他の遺伝子を挿入又は置換することが挙げられる。

【0013】本発明でいう非ヒト動物は、Msi2遺伝子、又はMsi2及びMsi1遺伝子の機能が欠損したもであればよく、Msi2遺伝子、又はMsi2及びMsi1遺伝子がヘテロに欠損している動物及びホモに欠損している動物のいずれもが含まれる。また、使用される動物は特に限定されず、ヒトを除く全ての動物が挙げられ、好ましくはモルモット、ハムスター、マウス、ラット、ウサギ、ブタ等の哺乳動物であり、病態モデルとしての扱いが容易で且つ生物サイクルが比較的短い齧歯動物、特にマウスが好ましい。

【0014】動物に遺伝子を導入してその動物の個体又は子孫にその遺伝子を発現させる手法としては、従来からトランスジェニック動物の作成に常用されている公知の手法を挙げることができ、例えば遺伝子DNAを受精卵の前核期胚に注入する方法、組換えレトロウイルスを初期胚に感染させる方法、相同組換えを起こさせた胚性幹細胞(ES細胞)を胚盤胞又は8細胞期胚に注入する方法等によって得られた宿主胚を動物に移植して産仔を得、これを他の個体と交配し、F1へテロ変異動物、さ

らにはF2ホモ又はヘミ変異動物を作成する方法が挙げられる。このうち、ES細胞を用いる遺伝子導入の方法は、相同組換えにより遺伝子を破壊(ノックアウト)するのに適しており、ES細胞に遺伝子を導入する工程とキメラ動物を作出する工程とを分けて行えるという利点を有しているので好ましい。ES細胞を用いる遺伝子導入の方法は、公知の方法に準じて行えばよい。

【0015】以下、ES細胞を用いた遺伝子の導入の方法について、マウスを例にして具体的に説明する。マウスのMsi2遺伝子機能の欠損には、プロモーター領域及び/又はコード領域の少なくとも一部を消失させるか、いずれかの部位に他の遺伝子を挿入すればよい。また、これらの遺伝子の機能を欠損させができる限り、消失又は他の遺伝子を挿入する部位は、イントロンであってもよい。そして、Msi2遺伝子との間で相同組換えを行うにあたり、このように遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA(ターゲティングベクター)を作製する。

【0016】挿入する遺伝子としては、Msi2遺伝子の欠損を検出するためのマークー遺伝子として機能する遺伝子を用いることが好ましく、そのような遺伝子としては、ポジティブ選別に用いるマークー遺伝子として、例えばネオマイシン(neo)耐性遺伝子が、ネガティブ選別に用いるマークー遺伝子として、例えばチミジンキナーゼ(tk)遺伝子やジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子等が用いられる。尚、ネオマイシン耐性遺伝子は、ネオマイシン類似体であるG418を用いることにより目的遺伝子の選別を可能にする。

【0017】好ましい遺伝子ターゲティングとしては、ターゲティングベクターとして、ポジティブ選別マークーが標的遺伝子の上に置換されている置換型ベクターを用いる方法と、標的遺伝子の上流に選択マークーを含むベクターのバックボーンにあたる非相同領域を挿入することによって、その遺伝子の発現を抑制する挿入型ベクターを用いる方法などが挙げられる。尚、これらの遺伝子の挿入は、インビトロで常用のDNA組換え技術により行うことができる。

【0018】次に、こうして得られたターゲティングベクターと、ES細胞中のMsi2遺伝子との間で相同組換えを行う。相同組換え用DNAのES細胞への導入は、例えば常用のエレクトロポレーションにより行うことができる。この相同組換えにおいては、ES細胞中のMsi2遺伝子のDNAと相同組換え用DNAの対応する領域との間で組換えが生じ、相同組換え用DNA中に挿入されていたマークー遺伝子がES細胞のゲノムのMsi2遺伝子に挿入される。この結果、ES細胞は、Msi2遺伝子の機能を欠損し、同時にマークー遺伝子を含むことになる。このマークー遺伝子の選別機能に基づいて、Msi2遺伝子の機能を欠損したES細胞を選別することができる。

【0019】次に、このES細胞をマウスの胚盤胞等の

宿主胚に注入し、得られた胚を偽妊娠マウスの子宮角に移植してキメラマウスを得る。このキメラマウスを適当な系統のマウスと交配することによりF1へテロ型の産仔を得る。キメラマウスの生殖細胞が相同組換え体、すなわちMs12遺伝子が破壊されているES細胞に由来していれば、Ms12遺伝子の機能が欠損したマウスを得ることができる。また、得られたヘテロ欠損動物同士を交配させ、その産仔の中からホモ欠損動物を得ることができる。

【0020】*Msi2*遺伝子の欠損や、該遺伝子がヘテロ又はホモに欠損したものであるかは、離乳に至った後に尾からDNAを抽出後、サザンプロット又はPCRを行って、確認することができる。

【0021】尚、本発明の動物の飼育方法は、特別な方法を用いる必要はなく、正常な動物と同様な方法により飼育することができる。

【0022】本発明により得られたMs12遺伝子、又はMs12及びMs11遺伝子の機能が欠損した動物は、後記実施例で示すように、ヒトの高血糖症や糖尿病と同様の症状、例えば膵臓においてインスリンとともにグルカゴンの異常発現を呈する。従って、本発明の動物は高血糖症、低血糖症及び糖尿病のモデル動物、これらの疾患発生のメカニズム解明用動物となり得る。

【0023】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0024】A. 材料と方法(1)マウスマルコニッキ小脳より得られたラムダgt11 cDNAライブラリー (Sakakibara et al., Dev. Biol. 176:230-242(1996)) はマウスマルコニッキ遺伝子コード領域 (Genbankアクセス番号#D4965、Sakakibara et al., Dev. Biol. 176:230-242(1996)) の1.1キロ塩基対のEcoRI断片およびアフリカツメガエルxrp1 cDNA (Genbankアクセス番号#L02953、Good et al., Nucl. Acids. Res. 21:999-1006(1993)) コード領域カルボキシル末端を含む387塩基対のBamHI-NdeI断片を用いてスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、 1×10^7 個のプローブに対して、マルコニッキ遺伝子プローブを用いて60°Cで、またxrp1 遺伝子プローブを用いて55°Cで、18時間から24時間の間、 5×10^5 cpm/mlの 32 P標識されたランダムプライムドプローブを含む緩衝液 (1M塩化ナトリウム、1%SDS、10%硫酸デキストラン、0.1mg/ml鮭精子DNA) 中で行った。ハイブリダイゼーションされたフィルターは、2×SSC、0.1%SDS (低ストリンジンシー) 中で室温にて20分間2回洗浄した。マルコニッキ遺伝子およびxrp1 遺伝子プローブ両方にハイブリダイズした32個の陽性クローンが得られた。その中でxrp1 cDNAに強くハイブリダイズした9個が選択され、pBluescriptII (Stratagene、ラホヤ、カリフォルニア州) にサブクローニングされ、そし

てダイブライマー-キット (Amersham Pharmacia Biotech, バッキンガムシャー、イギリス) を用いて定法のダイデオキシヌクレオチドシークエンス法により塩基配列が決定された。シークエンス解析では、マウス *musashii2* (*msi2*) と名づけた、0.5キロ塩基対の5' 非翻訳領域、0.8キロ塩基対の3' 非翻訳領域、および1.0キロ塩基対の推定オープンリーディングフレーム (ORF) にわたる複数の重複クローンが明らかになった。推定上の選択スプライシングされるエクソンが予測コード領域のカルボキシル末端に54塩基対の挿入として発見され、*msi2* cDNA のショートフォームとロングフォームのORFを形成していた。ショートフォームとロングフォームの *msi2* 転写物の *in vivo* での発見はE12胎生期と成体の脳から単離されたRNAの逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 解析により確認された。類似性検索とアライメントがBLASTとFASTAアルゴリズムを用いてNCBIサーバーで行われた。系統樹解析 (DDBJのWWWサーバー上のclustalWプログラム) に用いられた蛋白質のアクセション番号は以下のとおりである。Hu(ヒト)U1snRNP70K(A25707)、Mus(マウス)hnRNP A1(NP034577)、Hu hnRNP A0(Q13151)、Mus hnRNPA2/B1(O88569)、Hu hnRNP A3(P51991)、Hu hnRNP A/Bタイプ(AAA36575)、ラット AUF1(BAB03468、BAB03466、BAB03467)、Mus hnRNP C1/C2(AAD03717)、Hu hnRNP F(S43484)、Mus hnRNP G(O35479)、Hu hnRNP H(I39358)、Mus PTB(hnRNPI)(P17225)、Mus brPTB(NP062423)、Hu hnRNP L(P14866)、Hu hnRNP M(P52272)、Hu hnRNP R(T02673)、Mus hnRNP U(NP058085)、Mus TIA-1(P52912)、Mus TIAR(S72436)、Mus HuR(NP034615)、Mus HuB(AAC52644)、Mus HuC(Q60900)、Mus HuD(JC2298)、Hu Bruno13(AAB09040)、Mus Lark(NP033058) およびRat La/SS-B(JC1494)。

【0025】(2)動物および組織調整組織蛋白質抽出液、RNA、または組織切片の調整に用いたICR (CD-1) マウスはCharles River Japan Inc. (日本) から購入した。妊娠日は臍胎の存在により決定され、胎生0日目 (E 0) として記録され、出生日をP0とした。

【0026】(3)ノーザンプロット解析各マウス組織および胎児よりトータルRNA(20 μ g)をメーカーの指示書に従いTrizol(Gibco-BRL、Grand Island、ニューヨーク州)を用いて単離した。1%アガロース-ホルムアルデヒドゲルの電気泳動で分離し、バイオダイヤBナイロン膜(Pall、Portwasington、ニューヨーク州)上にトランスファーした。マウスマsi2 cDNA 750塩基対の3' 非翻訳領域断片の³²P標識プローブは、ランダムプライムドDNA標識キット(Roche Diagnostics、マンハイム、ドイツ)を用いて調整し、50%ホルムアルデヒド、6×SSPE、5×デンハート液、0.5%SDS、および200 μ g/mlの鮑精子DNA中にて42°Cで16時間ハイブリダイズした。インキュベーション後、0.1×SSC、0.1%SDS中にて50°Cで厳密に洗浄し、フィルターはKodak X-OMATフィルムに48時

間露光した。トランスファーしたRNA標本の完全性は、各プロットを放射標識ベータアクチングローブ (Clontech、パロアルト、カリフォルニア州) を用いて再プローブして確認を行った。

【0027】(4) 抗Msi2抗体の作製と精製Msi2蛋白質の14アミノ酸の末端配列 (MEANGSPGTGSAN) に相当する、システインアミド残基が続くペプチドを抗体作製のために合成した。このペプチド配列はRNA結合ドメインであるRRM1の配列とは重複せず、Msi1蛋白質の対応するN末端領域とはいかなる類似性も示さない。約15mgのペプチドをシステインアミド残基を介して、m-ブロモスクシニミド処理されたキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に結合し、ニュージーランドシロウサギに免疫性を与えるために使用した。抗Msi2抗血清をアフィニティ精製するため、メーカーの指示書に従い、合成ペプチド (5mg) を活性化した2-フルオロ-1-メチルピリヂニウム-トルエン-4-スルホン酸塩 (FMP) セルロファイン (Seikagaku Kogyo、日本) に共有結合させた。フィルターロ過 (0.45μm) した全抗血清10mlを、TBS緩衝液 (0.15M 塩化ナトリウム、20mMトリス塩酸塩、pH7.5) を用いて事前に平衡化したペプチド-FMPセルロファインアフィニティ樹脂3mlとともに4°Cでインキュベートした。その後1M塩化ナトリウム50ml、1%トライトンX-100、トリス塩酸塩20mM (pH 7.5) 、続いて0.15M塩化ナトリウム20mlを用いて樹脂を洗浄し、100mMグリシン塩酸塩4ml (pH 2.0) を用いて4°Cで溶出し、直ちに1Mトリス0.2mlで中和した。

【0028】(5) 組み換えMsi1およびMsi2蛋白質Msi2蛋白質のショートフォームとロングフォームのORFに相当する983塩基対と1072塩基対のBamHI-EcoRI断片はE12胎生期および成体の脳のRNAからRT-PCRにより単離した。発現ベクターpRSET-A (Invitrogen、Carlsbad、カリフォルニア州) にインフレームにサブクローニングし、pRSET-Msi2S (ショートフォーム) とpRSET-Msi2L (ロングフォーム) を構築し、6ヒスチジン残基をアミノ末端に有する融合蛋白質が生成した。発現ベクターpRSET-Msi1 (Sakakibara et al., 1996) 、pRSET-Msi2S、およびpRSET-Msi2LはBL21 (DE3) pLysS大腸菌株に導入し、1mM IPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド) を用いて30°Cで6時間インキュベーションすることで融合蛋白質を誘導した。組み換え融合蛋白質 (His₆-Msi2S、His₆-Msi2L、およびHis₆-Msi1) は、供給メーカーの指示通りに、Probond樹脂 (Invitrogen) カラムを用いてアフィニティ精製した。融合蛋白質の純度と濃度は、溶出液のSDSポリアクリルアミド (PAGE) ゲルをクマシーブリリアントブルー (Sigma) 染色、およびブラッドフォード定量法 (Biorad、ヘラクレス、カリフォルニア州) で確認した。

【0029】(6) プロテインフォスファターゼ処理および免疫プロッティング法組織抽出液は緩衝液A (50mMト

リス塩酸塩 pH7.6、1mM酢酸カリウム、1.5mM酢酸マグネシウム、2mMジチオスレイトール (DTT) 、100μg/mlフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) 、5μg/mlアプロチニン、5μg/mlロイペプチド) を用いてホモジナイズし、続いて10,000×gにて10分間遠心分離した。細菌で発現した精製組み換え蛋白質 (50ng/レーン) または組織抽出液 (蛋白質量30μg/レーン) は10%SDS-PAGEゲルで分離し、セミドライ転写装置を用いてImmobilin-P膜 (Millipore、ベッドフォード、マサチューセッツ州) にエレクトロプロットした。各組織から等量の総蛋白質がロードされたことは、標準ブラッドフォード定量法で確かめ、二重複製ゲルをクマシーブルー染色することで立証した。化学発光シグナルは、メーカーの指示に従い、ECL (Amersham Pharmacia Biotech) によりKodak X-OMATフィルムを用いて検出した。蛋白質脱リン酸化測定を行うため、内在性のMsi2蛋白質が胎生期脳抽出液 (E12.5) より部分精製した。E12.5の脳 (湿重量で1.0g) を緩衝液A5mlにホモジナイズし、遠心分離して核を沈殿させた (12,000×g、10分間、4°C)。上清を取り除き、ショ糖1.5ml (緩衝液A中にて30% w/v) のクッショングループに静かに重層し、130,000×g、4°Cで2時間、Beckman SW55Tiローターを用いて遠心分離した。S130上清とショ糖クッショングループを除いた後、沈殿したポリソーム画分をすすいで取り出し、緩衝液A 500μl中に再懸濁した。かなりの量のMsi2蛋白質をこのポリソーム画分から回収した。プロテインフォスファターゼ処理のために、精製ポリソーム画分由來の蛋白質10μgを、25μlの50mMトリス (pH7.5) 、0.1mM EDTA、5mM DTT、0.01%ブリッジ35、2mM塩化マンガン、10μg/ml PMSF、5μg/mlアプロチニン、5μg/mlロイペプチド中で800ユニットのラムダプロテインフォスファターゼ (λPPAse) (New England Bio Labs、Beverly、マサチューセッツ州) とともに30°Cで1時間インキュベートした。λPPAseはリン酸化されたセリン、スレオニン、チロシン残基を脱リン酸化する。λPPAseを含まない対照サンプルも上述のようにインキュベートした。反応はSDS-PAGEサンプル緩衝液を用いて停止し、免疫プロッティング法に関して10%SDS-PAGEゲルにて分離した。

【0030】(7) *in vitro*転写/翻訳およびRNA結合アッセイ Msi2ロングフォームのコード領域 (524-1564番の塩基) とMsi1のコード領域 (64-1152番の塩基、アクセシビリティ番号D49654) に相当するcDNA断片を、FLAGタグをアミノ末端にコードするプライマーを用いてPCRにより単離した。pCDNA3 (Invitrogen) にサブクローニングし、発現ベクターpCDNA-msi2およびpCDNA-msi1を構築した。これらのプラスミドはウサギ網状赤血球溶解液 (TNT T7 Quick coupled転写/翻訳系、Promega、マジソン、ウィスコンシン州) 中で、メーカーの推奨する条件に従い、0.4mCi/ml ³⁵Sメチオニン (Amersham Pharmacia Biotech) 存在下にて転写/翻訳させた。61キロダルトン

のルシフェラーゼ蛋白質をコードするルシフェラーゼT7コントロールベクター (Promega) もまた上述のとおりにin vitroで翻訳させた。in vitro翻訳された蛋白質のRNAホモポリマーへの結合については若干の変更を加えたが、基本的には以前に記載されたように行った (Swanson and Dreyfuss, 1988)。簡潔に述べると、結合緩衝液 (10mMトリス塩酸塩、pH7.4、2.5mM塩化マグネシウム、0.5%トライトンX-100、2mg/mlペプチド、2mg/mlロイペプチド、0.5%アプロチニン、1mg/mlヘパリン) により平衡化した各20μlのリボホモポリマー-アガロースビーズを³⁵S標識された蛋白質 (1×10⁵ cpm)とともに、100mMまたは250mMの塩化ナトリウムを含む500μlの結合緩衝液中にて、15分間振動台上で4°Cにてインキュベートした。ビーズは短時間の回転で沈殿し、50μl SDS-PAGEローディング緩衝液に再懸濁する前に結合緩衝液500μlで5回洗浄した。結合した蛋白質は煮沸により溶出させ、10% SDS-PAGEにて分離して、フルオログラフィーにより可視化させた。

【0031】(8)ターゲティングベクターの構築ネオマイシン耐性遺伝子の上流に、Msi1の開始コドンを含む第一エキソンの上流に存在する4.4kbのXbaIの断片、下流にRRM-A領域をコードする領域を含む第二エキソンの下流に存在する3.9kbのEcoRV-Ecl1136I断片をつなげ、2度の相同性組換えによってMsi2遺伝子の102アミノ酸をDNAがネオマイシン耐性遺伝子に置換されるようにデザインされたターゲティングベクターを用いた (図1及び2)。

【0032】(9)キメラマウスの作製ターゲティングベクターをトランスフェクションすることによって、片方のMsi2遺伝子座をネオマイシン耐性遺伝子に置換したES細胞 (129SvJ/RW-4株)を、C57BL/6マウスを (C57BL/6×D BA) F1マウスと交配させて得られた胚細胞に注入し、キメラ動物を誕生させた。各ES細胞株に由来する雄キメラをC57BL/6雌と交配させ、ヘテロ接合体F1子孫を出生させた。F1ヘテロ接合体同士を交配し、Msi2-/マウスを取得した。

【0033】B.結果(1)Msi2の同定とその一次構造の特性Msi2のcDNAの単離を目的に、マウスmsi1およびXenopus xrp1 cDNAプローブを用いて、低減したストリンジェンシーにて、マウス神経系cDNAライブラリーをスクリーニングした。Xenopus xrp1遺伝子 (Good et al., Nucl. Acids Res. 21:999-1006 (1993)) はMsi1 (Skakaibara et al., Dev. Biol. 176:230-242 (1996)) のアフリカツメガエル相同体であるNRP1蛋白質に配列上関連付けられる蛋白質をコードしている。全長cDNAを得るために、獲得された最長のDNAを、厳しいストリンジェンシーにてcDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして用いた。予測分子量37キロダルトンの346アミノ酸の蛋白質をコードする最長かつ唯一のオープンリーディングフレームが、9個の重複したcDNAより同定された。配列解析により、cDNAにコードされる遺伝子産物が新規

のRNA結合蛋白質であることが明らかとなった。我々はこのMsi1関連遺伝子をmusashi2 (msi2) と名づけた。ライブラリースクリーニングから得た複数のcDNAクローニング、およびE12と成体のマウス脳から単離したRNA由来のmsi2転写物について、RT-PCR解析することで2種の選択スプライスされた転写産物が存在することが示された。この2種はMsi2のカルボキシ末端半分内の短いセグメント (18アミノ酸) の存在、非存在により分けられる。この選択スプライスは、予測分子量36.9および35.7キロダルトン (Msi2LおよびMsi2Sと各々名づけた) の2種のMsi2蛋白質のアイソフォームが生成することを示している。Msi2Lのアミノ酸配列を配列番号1に、Msi2のアミノ酸配列を配列番号2に示した。またMsi2Lの塩基配列を配列番号4に、msi2Sの塩基配列を配列番号5に示した。

【0034】(2)Msi2遺伝子欠損マウスの性質Msi2-/マウスは肉眼的には正常であったが、脾臓のランゲルハンス島において、アルファ細胞とベータ細胞の局在に異常があった。(図3:緑が抗インスリン抗体を用いて染色したベータ細胞を示し、赤がグルカゴン抗体を用いて染色したアルファ細胞を示す。)図に示したように、野生型のランゲルハンス島ではベータ細胞塊の外側をアルファ細胞が覆うような構造を示すが、Msi2-/マウスにおいてはベータ細胞がインスリンと共にグルカゴンを発現している。

【0035】(3)Msi2及びMsi1遺伝子欠損マウスの性質Msi1+/- (特開2001-17027)・Msi2+/- (Msi1,2ダブルヘテロ) のマウス同士を交配させる(図4)と、メンデルの法則に従うとMsi1+/-・Msi2+/- (Msi1,2ダブルホモ) マウスは1/16の確立で産まれるが、実際には産まれた全個体数164匹に対してMsi1+/-・Msi2+/-マウスは7匹しか産まれなかった。これは、約1/23であり、Msi1+/-・Msi2+/- (Msi1,2ダブルホモ) マウスが産まれる確立はメンデリズムと比較して若干少なく、胎生期において死亡が推測された。出生した個体も、チアノーゼの様相を呈し、母乳を飲んでおらず、出生後数時間で死亡した(図5)。またMsi1+/-・Msi2+/- (Msi1,2ダブルホモ) マウスは、Msi2+/-マウス同様、ランゲルハンス島において、アルファ細胞とベータ細胞の局在に異常があった(図3)。Msi1+/-・Msi2+/- (Msi1,2ダブルホモ) マウスはMsi2-/マウスに比べ、アルファ細胞がベータ細胞塊に入り込むなどの症状も見られ、より重度の異常が見られた。

【0036】

【発明の効果】本発明のMsi2遺伝子、又はMsi2及びMsi1遺伝子欠損動物は、Msi1及びMsi2の内分泌系細胞における役割を解明するために有用であり、高血糖症、低血糖症、糖尿病等のモデル動物としても有用であり、これらの疾患治療薬のスクリーニングに使用することもできる。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Animal deficient in Musashi2 gene

<130> P01951404

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 346

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Glu Ala Asn Gly Ser Pro Gly Thr Ser Gly Ser Ala Asn Asp Ser
 1 5 10 15
 Gln His Asp Pro Gly Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Gln Thr
 20 25 30
 Ser Pro Asp Ser Leu Arg Asp Tyr Phe Ser Lys Phe Gly Glu Ile Arg
 35 40 45
 Glu Cys Met Val Met Arg Asp Pro Thr Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe
 50 55 60
 Gly Phe Val Thr Phe Ala Asp Pro Ala Ser Val Asp Lys Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Gln Pro His His Glu Leu Asp Ser Lys Thr Ile Asp Pro Lys Val Ala
 85 90 95
 Phe Pro Arg Arg Ala Gln Pro Lys Met Val Thr Arg Thr Lys Lys Ile
 100 105 110
 Phe Val Gly Gly Leu Ser Ala Asn Thr Val Val Glu Asp Val Lys Gln
 115 120 125
 Tyr Phe Glu Gln Phe Gly Lys Val Glu Asp Ala Met Leu Met Phe Asp
 130 135 140
 Lys Thr Thr Asn Arg His Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe Glu Asn
 145 150 155 160
 Glu Asp Val Val Glu Lys Val Cys Glu Ile His Phe His Glu Ile Asn
 165 170 175
 Asn Lys Met Val Glu Cys Lys Arg Ala Gln Pro Lys Glu Val Met Phe
 180 185 190
 Pro Pro Gly Thr Arg Gly Arg Ala Arg Gly Leu Pro Tyr Thr Met Asp
 195 200 205
 Ala Phe Met Leu Gly Met Gly Met Leu Gly Tyr Pro Asn Phe Val Ala
 210 215 220
 Thr Tyr Gly Arg Gly Tyr Pro Gly Phe Ala Pro Ser Tyr Gly Tyr Gln
 225 230 235 240
 Phe Pro Gly Phe Pro Ala Ala Ala Tyr Gly Pro Val Ala Ala Ala
 245 250 255

Val Ala Ala Ala Arg Gly Ser Val Leu Asn Ser Tyr Ser Ala Gln Pro
 260 265 270
 Asn Phe Gly Ala Pro Ala Ser Pro Ala Gly Ser Asn Pro Ala Arg Pro
 275 280 285
 Gly Gly Phe Pro Gly Ala Asn Ser Pro Gly Pro Val Ala Asp Leu Tyr
 290 295 300
 Gly Pro Ala Ser Gln Asp Ser Gly Val Gly Asn Tyr Ile Ser Ala Ala
 305 310 315 320
 Ser Pro Gln Pro Gly Ser Gly Phe Gly His Gly Ile Ala Gly Pro Leu
 325 330 335
 Ile Ala Thr Ala Phe Thr Asn Gly Tyr His
 340 345
 <210> 2
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Mouse
 <400> 2
 Met Glu Ala Asn Gly Ser Pro Gly Thr Ser Gly Ser Ala Asn Asp Ser
 1 5 10 15
 Gln His Asp Pro Gly Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Gln Thr
 20 25 30
 Ser Pro Asp Ser Leu Arg Asp Tyr Phe Ser Lys Phe Gly Glu Ile Arg
 35 40 45
 Glu Cys Met Val Met Arg Asp Pro Thr Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe
 50 55 60
 Gly Phe Val Thr Phe Ala Asp Pro Ala Ser Val Asp Lys Val Leu Gly
 65 70 75 80
 Gln Pro His His Glu Leu Asp Ser Lys Thr Ile Asp Pro Lys Val Ala
 85 90 95
 Phe Pro Arg Arg Ala Gln Pro Lys Met Val Thr Arg Thr Lys Lys Ile
 100 105 110
 Phe Val Gly Gly Leu Ser Ala Asn Thr Val Val Glu Asp Val Lys Gln
 115 120 125
 Tyr Phe Glu Gln Phe Gly Lys Val Glu Asp Ala Met Leu Met Phe Asp
 130 135 140
 Lys Thr Thr Asn Arg His Arg Gly Phe Gly Phe Val Thr Phe Glu Asn
 145 150 155 160
 Glu Asp Val Val Glu Lys Val Cys Glu Ile His Phe His Glu Ile Asn
 165 170 175
 Asn Lys Met Val Glu Cys Lys Arg Ala Gln Pro Lys Glu Val Met Phe
 180 185 190
 Pro Pro Gly Thr Arg Gly Arg Ala Arg Gly Leu Pro Tyr Thr Met Asp
 195 200 205
 Ala Phe Met Leu Gly Met Gly Met Leu Gly Tyr Pro Asn Phe Val Ala
 210 215 220
 Thr Tyr Gly Arg Gly Tyr Pro Gly Phe Ala Pro Ser Tyr Gly Tyr Gln
 225 230 235 240
 Phe Pro Gly Phe Pro Ala Ala Ala Tyr Gly Pro Val Ala Ala Ala
 245 250 255

Val Ala Ala Ala Arg Gly Ser Gly Ser Asn Pro Ala Arg Pro Gly Gly
 260 265 270
 Phe Pro Gly Ala Asn Ser Pro Gly Pro Val Ala Asp Leu Tyr Gly Pro
 275 280 285
 Ala Ser Gln Asp Ser Gly Val Gly Asn Tyr Ile Ser Ala Ala Ser Pro
 290 295 300
 Gln Pro Gly Ser Gly Phe Gly His Gly Ile Ala Gly Pro Leu Ile Ala
 305 310 315 320
 Thr Ala Phe Thr Asn Gly Tyr His
 325
 <210> 3
 <211> 2370
 <212> DNA
 <213> Mouse
 <400> 3
 cgccaaactgc cttccaagt kgcacactgt acatctgtga gtgggttta gtgtctgggt 60
 gtgaacctca aagagagaga acatctactt ctaggcctc acactgaagg gacctgggc 120
 agtcattaa aaagaactct gaagttcaa atggatgcc tagtcagagc acatagattt 180
 ccctaccctg acataaaaaat attcttagct aaagtcgcca gaattaaatgt aatgattaaaa 240
 ttctctcaca ggatattttt aacattgttt acatatgaaa tgtgcatttg ctgcatttg 300
 ctactgtcca atatgcgggt catataact ggacctcgag tggatggaaatc atcccaatgt 360
 ggtttctca acactggccc catcccaatg caaaacggct ccacgcgtgt ggtgtggcac 420
 cctcttttgg ggcttagagt tcttgcagc tcttgggtt atgaaggctg tagatgtga 480
 tgtcatgcac ctttgtact ctttccaaa ttgggctcc gctatggagg caaatggag 540
 cccaggcacc tcggcagcgg ccaacgactc ccagcacgac cccggtaaaa tgtttatgg 600
 tggactgagc tggcagaccc taccatggat ctttagagac tattttatgc aattttggaga 660
 aatttagagaa tgtatggca tgagagatcc cacaacggaaa cgctccagag gtttgggtt 720
 cgtcaccc tcagaccccg caagtgtaga taaagtattt ggtcagcccc accatggatgtt 780
 agatccaaag acgattgacc caaaaattgc atttcctgtt cgagccaaac ctaatgtgtt 840
 cacaagaaca aagaaaatct tcgttagggg attgtctgcg aacacatggatgtt 900
 aaagcgttat ttgcggcgtt ttggcaaggtt agaggatgcg atgtatgtt tcgacaaaac 960
 caccaacagg cacagagggt ttggctttgtt cacctttggat aatggatggc ttgtggagaa 1020
 agtctgttagg attcatttcc atgaaatcaa taataaaaatgt gtggatgtt agaaagctca 1080
 gcccggaaa gtcgttcc caccctggac aagaggccgg gcccggggc tgccatcac 1140
 catggatgcg ttcatgttgc gcatggggat gtcgttgc cccactttt tgccaaaccta 1200
 tgccagggc taccctggat ttgttgcgtt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1260
 agcagtttat ggaccagtgg cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1320
 tagctacagt gtcgttgc cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1380
 gggccgggaa ggtttcccg gggccaaacag cccaggaccc gtcgttgc cttttttttt 1440
 tgccagggc gactccggag tggggatataa cataaggccgg gcccggggc 1500
 cggcttcggc caccggcatag ctggacccctt gattggcaacg gcctttacaa atggataacca 1560
 ctggcggc gtcgttgc cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1620
 ctggcggc gtcgttgc cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1680
 cagcctact cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1740
 atctcaccctt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1800
 ccatgatttt ggtttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1860
 tttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 1920
 acccagcttta atatcttagttt aaagcttaacc atatgtataact tttttttttt cttttttttt 1980
 tttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 2040
 tctgttctcg cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt cttttttttt 2100

ttctgagact gtaagacttt tcacgtggca ctttagcaca cactgaatcg aagttgtgtat 2160
acggcgagcg ggaggtggcc atagactcta ttttgtgtt tagaagtgcac atacagttgg 2220
ctgcttaaca gactctctag ccgttcattt ttgtgacgctc tctttgttaa cctaagtata 2280
tctattttcg gcaataaggta aaggacggcc gtgttttgag ggttttcctt tcctatgagt 2340
gtttttctt ttcttctgtt caaagaggc 2370
<210> 4
<211> 1038
<212> DNA
<213> Mouse

atggaggcaa atggagcccc aggccacctcg ggcagcgcca acgactccca gcacgacccc 60
 ggtaaaatgt ttatcggtgg actgagctgg cagacacctac cagatagct tagagactat 120
 tttagcaaat ttggagaaaat tagagaatgt atgtcatga gagatcccac aacgaaacgc 180
 tccagaggtc tcggttcgt caccttcgca gacccagcaa gtglagataa agtattaggt 240
 cagccccacc atgagttaga ttccaagacg attgacccaa aagttgcatt tcctcgatcga 300
 gcgcaccccta agatggtcac aagaacaaag aaaatctcg taggaggatt gtctcgac 360
 acagtagtgg aagatgtaaa gcagtttc gagcagtttgc acaaggtaga ggatgcgtat 420
 ctgtatgttcg acaaaaaccac caacaggcac agagggtttgc ttgttcgtatc ctttggaaat 480
 gaagacgttg tggagaagt ctgttagatt catttcatg aaatcaataa taaaatgtta 540
 gaatgtaaat aagctcagcc gaaagaagtc atgttccac ctggacaag aggccggcc 600
 cggggctgc catacaccat ggtatgttc atgtttggca tggatgtct gggctacccc 660
 aactttgtgg caacctatgg cagaggctac cccggatttgc ttgttacccat 720
 ttcccgaggct tcccgccagc agcttatgttgc ccagtggcag cgccagctgt ggcagcgct 780
 cgaggatcgat tcctgtatag ctacatgttgc caaccgttgc ttggcgcc cgtttcccg 840
 gcaggatcttca accccggccgc gccccggggc ttcccgccggc ccaacagcccc aggacctgtc 900
 gccccatcttca acggccctgc cagccaggac tccggatgttgc ggaattatcat aagccgcggcc 960
 accccacagc cgggtccgg ctccggccac ggcataatgttgc gacccatgttgc tgcacccggcc 1020
 ttccaaatgttgc gataccac 1038

<210> 5
<211> 984
<212> DNA
<213> Mouse
<400> 5
atggaggcaa atgggagccc aggacacctg ggcagcgcca acgactccca gcacgacccc 60
ggtaaaaatgt ttatcggtgg aclgagctgg cagacccac cagatagccct tagagactat 120
tttagcaaat ttggagaaaat tagagaatgt atgtcatga gagatcccac aacgaaacgc 180
tccagaggttctcggttgcac cacccgcac gacccgaaat gtgttagataa agtatttagt 240
cagccccacc atgagtttaga ttccaaagacg attgacccaa aagtgcatt tctctgtcga 300
gccaaccta agatggtcac aagaacaaag aaaatctcg taggaggatt gtctgcac 360
acagtagtgttgg aagatgtaaa gcagtatttc gagcagtttgc acaaggtaga ggtatgcatg 420
ctgtatgttcg acaaaaaccac caacaggcac agagggtttgc tcttgcac ctttggaaat 480
gaagacgttg tggagaaaatgt ctgtgagatt catttccatg aaatcaataaa taaaatggta 540
gaatgtttaga aagctcgtcc gaaagaagtc atgttccac ctggacaag aggccggcc 600
cgggggctgc catacaccat ggtgcgttc atgttggca tggggatgtt gggctacccc 660
aactttgtgg caacctatgg cagaggctac cccggatttgc ctcttagcta tggctaccag 720
ttcccgatgttcccgccagc agctttaggttgc ccagtggcag cggcagctgt ggcagcggt 780
cgaggatcgttgc tcccaaccc ggcgcggcc gggggatcc cggggccaa cagcccaaggaa 840
cctgtcgccg atctctatgg ccctggccagc cagacttgcg ggtggggaa ttacataaggc 900
ggggccagcc cacagccggg ctccgggttc ggcacggca tagtggacc tttgattgtca 960

acggcctta caaatggata ccac	984
<210> 6	
<211> 1551	
<212> DNA	
<213> mouse	
<220>	
<221> CDS	
<222> (64)..(1152)	
<400> 7	
cgccgagcgc cgcgcgcgc ggcgcgcgc cgcgcgcgc gcgcgcgcgc cgcgcgcgc 60	
ccg atg gag act gac gcg ccc cag ccc ggc ctc gcc tcc ccg gac tcg	108
Met Glu Thr Asp Ala Pro Gln Pro Gly Leu Ala Ser Pro Asp Ser	
1 5 10 15	
ccg cac gac ccc tgc aag atg ttc atc gga gga ctc agt tgg cag acc	156
Pro His Asp Pro Cys Lys Met Phe Ile Gly Gly Leu Ser Trp Gln Thr	
20 25 30	
acg cag gaa ggg ctg cgc gaa tac ttc ggc cag ttc ggg gag gtg aaa	204
Thr Gln Glu Gly Leu Arg Glu Tyr Phe Gly Gln Phe Gly Glu Val Lys	
35 40 45	
gag tgt ctg gtg atg cgg gac ccc ctg acc aaa aga tcc agg ggt ttc	252
Glu Cys Leu Val Met Arg Asp Pro Leu Thr Lys Arg Ser Arg Gly Phe	
50 55 60	
ggc ttc gtc act ttc atg gac cag gcg ggg gtg gat aaa gtg ctg cgc	300
Gly Phe Val Thr Phe Met Asp Gln Ala Gly Val Asp Lys Val Leu Ala	
65 70 75	
caa tcg cgg cac gag ctc gac tcc aaa aca att gac ccc aag gtg gcc	348
Gln Ser Arg His Glu Leu Asp Ser Lys Thr Ile Asp Pro Lys Val Ala	
80 85 90 95	
ttt cct cga aga gca cag cct aag atg gtc act cgg acg aag aag atc	396
Phe Pro Arg Arg Ala Gln Pro Lys Met Val Thr Arg Thr Lys Lys Ile	
100 105 110	
ttc gtg ggg ggg ctg tct gtg aac acc acg gtg gaa gat gtg aaa cac	444
Phe Val Gly Leu Ser Val Asn Thr Thr Val Glu Asp Val Lys His	
115 120 125	
tat ttc gag cag ttc gga aag gtg gat gat gcc atg ctg atg ttc gac	492
Tyr Phe Glu Gln Phe Gly Lys Val Asp Asp Ala Met Leu Met Phe Asp	
130 135 140	
aaa acc acc aac agg cac aga ggg ttt gga ttt gtc acg ttt gag agc	540
Lys Thr Thr Asn Arg His Arg Gly Phe Gly Val Thr Phe Glu Ser	
145 150 155	
gag gac atc gta gag aaa gtt tgt gag atc cac ttc cat gaa atc aac	588
Glu Asp Ile Val Glu Lys Val Cys Glu Ile His Phe His Glu Ile Asn	
160 165 170 175	
aac aaa atg gtg gaa tgc aag aaa gcc cag cca aag gag gtg atg tcc	636
Asn Lys Met Val Glu Cys Lys Lys Ala Gln Pro Lys Glu Val Met Ser	
180 185 190	
ccg aca ggc tca gcc cgg ggc agg tct cgg gtc atg ccc tac gga atg	684
Pro Thr Gly Ser Ala Arg Gly Arg Ser Arg Val Met Pro Tyr Gly Met	
195 200 205	

gat gcc ttc atg ctg ggt att ggg atg ctg ggt tac cca ggg ttc caa	732
Asp Ala Phe Met Leu Gly Ile Gly Met Leu Gly Tyr Pro Gly Phe Gln	
210 215 220	
gcc acg acc tac gcc agc cgg agt tac aca ggc ctt gcc cct ggt tac	780
Ala Thr Thr Tyr Ala Ser Arg Ser Tyr Thr Gly Leu Ala Pro Gly Tyr	
225 230 235	
acc tac cag ttc ccc gaa ttc cgt gta gag cgg agc ect ctc ccc agc	828
Thr Tyr Gln Phe Pro Glu Phe Arg Val Glu Arg Ser Pro Leu Pro Ser	
240 245 250 255	
gcc cca gtc ctc ccc gag ctc aca gct atc cct ctc acg gct tat ggg	876
Ala Pro Val Leu Pro Glu Leu Thr Ala Ile Pro Leu Thr Ala Tyr Gly	
260 265 270	
ccc atg gcg gca gca gca gca gca gct gta gtt cga ggg aca ggc	924
Pro Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Gly Thr Gly	
275 280 285	
tct cac ccc tgg acg atg gct ccc cct cca ggt tcc act ccc agc cgc	972
Ser His Pro Trp Thr Met Ala Pro Pro Pro Gly Ser Thr Pro Ser Arg	
290 295 300	
aca ggg ggc ttc cta ggg acc aca aca agc ccc ggc ccc atg gct gag ctc	1020
Thr Gly Gly Phe Leu Gly Thr Thr Ser Pro Gly Pro Met Ala Glu Leu	
305 310 315	
tac ggg gca gcc aac cag gac tcc ggg gtc agc agt tac atc agc gcc	1068
Tyr Gly Ala Ala Asn Gln Asp Ser Gly Val Ser Ser Tyr Ile Ser Ala	
320 325 330 335	
gcc agc ccc gcc ccc agc act ggt ttc ggc cac agt ctt ggg ggt ccc	1116
Ala Ser Pro Ala Pro Ser Thr Gly Phe Gly His Ser Leu Gly Gly Pro	
340 345 350	
ttg att gcc aca gcc ttc acc aat ggg tac cac tga aacaggagg	1162
Leu Ile Ala Thr Ala Phe Thr Asn Gly Tyr His	
355 360	
aggtgcagg agcgcggcag cctgcagctg actgaggacc agactgagcc agcaaggaga	1222
ttggacacc tccgcgcag cagccgcgc cctggctgc cacttggacc gctactgcct	1282
gtccctcaac ccctggccgc agccccctca tgcgtggctc ccctactaac ctctgttca	1342
gaccttgtct ctctctctgc tccacactgc ctctctccct ggtcgctttt atttattttt	1402
ggattageca gttgcctac cccccacacea gatctgcct ctctccgt ctgccttate	1462
cctccctgtc gccccctta gggcaccccc cccccagaaa ggcatactg gagggcggc	1522
agagggggcc tgctgcagac tgaggcccc	1551

【図面の簡単な説明】

【図1】ターゲティングベクター構築のストラデジー（前半）を示す図である。

【図2】ターゲティングベクター構築のストラデジー（後半、図1のつづき）を示す図である。

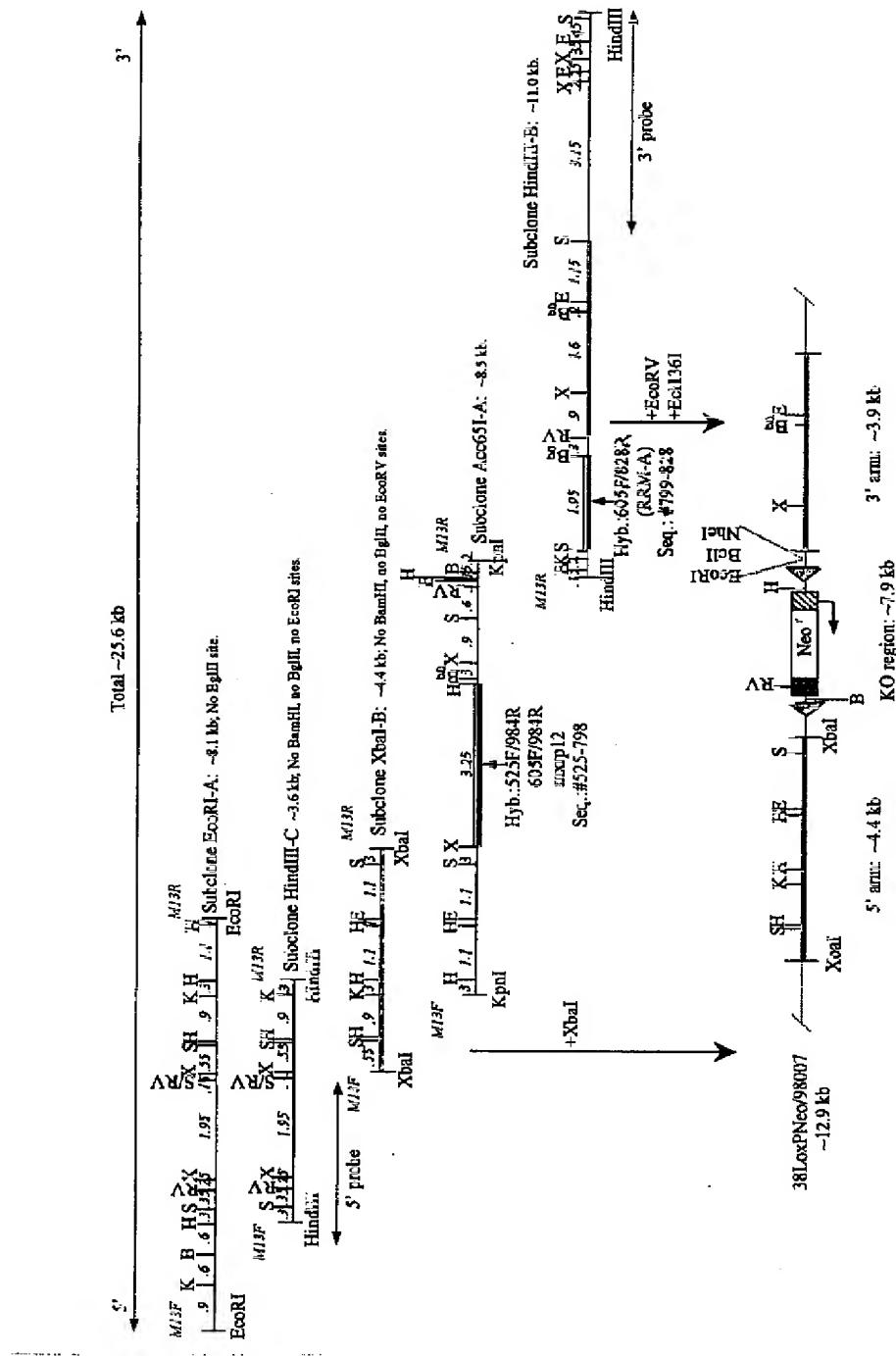
【図3】Msi2-/マウスの臍臍ランゲルハンス島におけるインスリンとグルカゴンの発現を示す図である。will

d:野生型、msi 1 ko:Msi1-/-、msi 2 ko:Msi2-/-、msi 1,2 ko:Msi1-/-・Msi2-/-（ダブルホモ）。

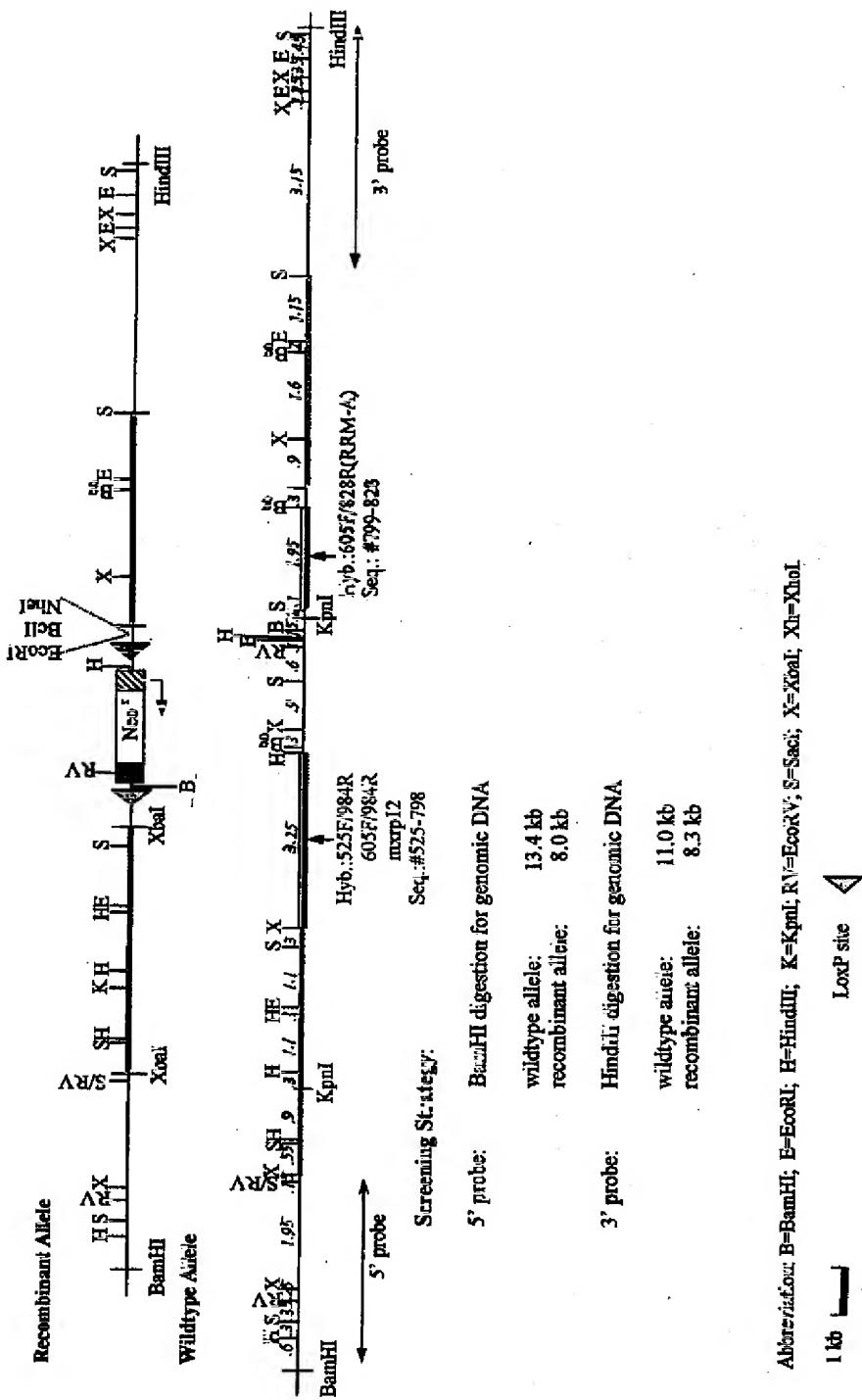
【図4】Msi1及びMsi2遺伝子欠損マウス作成のストラデジーを示す図である。

【図5】Msi1及びMsi2遺伝子欠損マウスの形態を示す図である。

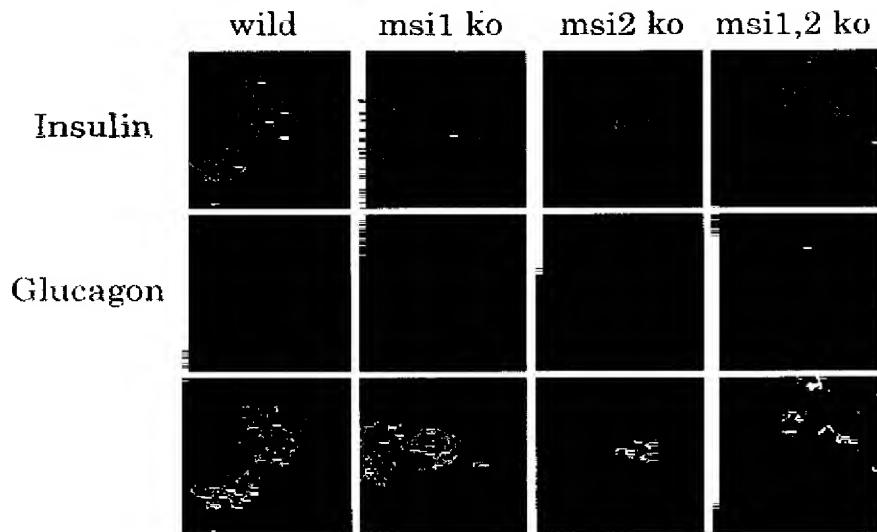
【図1】



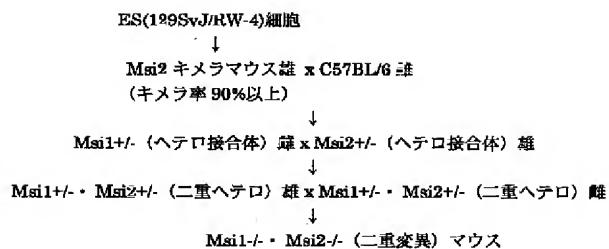
【図2】



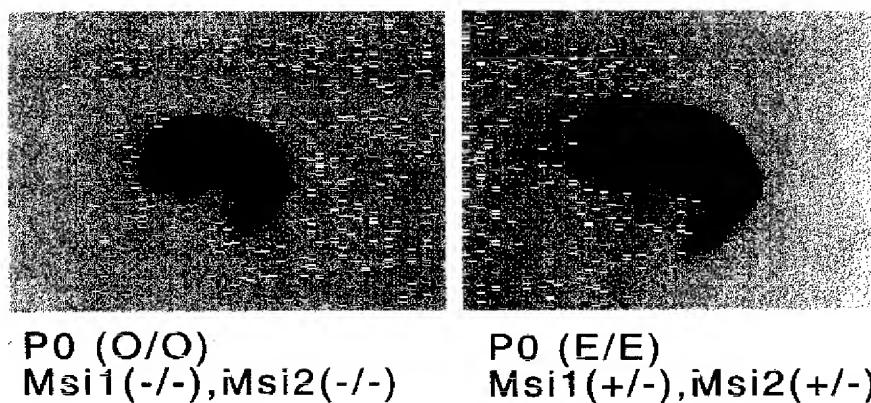
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 吉田 哲
東京都新宿区富久町2-4 ウエストビル
ズ101

(72)発明者 德永 晓憲
東京都渋谷区西原2-28-2 ガラーステ
ージ渋谷西原604号

(72)発明者 澤井 啓子
東京都港区六本木1-9-35 六本木ビュ
ータワー1206号

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA02 DA02 GA11
HA11